

10/531321

JC13 Rec CT/PTO 14 APR 2005

DOCKET NO.: 270475US0PCT

#2

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Hiroyuki EBINUMA  
SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION  
FILED: HERewith  
INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP03/13547  
INTERNATIONAL FILING DATE: October 23, 2003  
FOR: DEFRUCTOSYLATION METHOD

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents  
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<b><u>COUNTRY</u></b>	<b><u>APPLICATION NO</u></b>	<b><u>DAY/MONTH/YEAR</u></b>
Japan	2002-308731	23 October 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP03/13547. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 08/03)

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

23.11.03

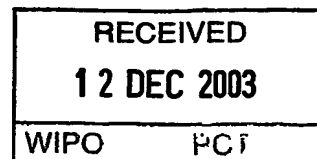
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 2 年 1 0 月 2 3 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 3 0 8 7 3 1  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 2 - 3 0 8 7 3 1 ]

出 願 人  
Applicant(s): 第一化学薬品株式会社

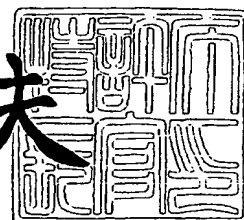


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 1 月 2 7 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P04781410

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県龍ヶ崎市向陽台 3-3-1 第一化学薬品株式会社  
社診断薬研究所内

【氏名】 海老沼 宏幸

【特許出願人】

【識別番号】 390037327

【氏名又は名称】 第一化学薬品株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000084

【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所

【代表者】 有賀 三幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 164232

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 脱フルクトシル化方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に、植物から抽出された脱フルクトシル作用を有する酵素を作用させることを特徴とする脱フルクトシル化方法。

【請求項 2】 植物から抽出された脱フルクトシル作用を有する酵素が、バラ科、ショウガ科、ブドウ科又はセリ科に属する植物から抽出されたものである請求項 1 記載の脱フルクトシル化方法。

【請求項 3】 フルクトシル化されているペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 1 ～ 5 のいずれかで表されるものである請求項 1 又は 2 記載の脱フルクトシル化方法。

【請求項 4】 フルクトシル化されているタンパク質が、ヘモグロビン A 1 c である請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載の脱フルクトシル化方法。

【請求項 5】 フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に対して、脱フルクトシル作用を有する酵素であって、バラ科に属する植物由来である酵素。

【請求項 6】 フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に対して、脱フルクトシル作用を有する酵素であって、ショウガ科に属する植物由来である酵素。

【請求項 7】 フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に対して、脱フルクトシル作用を有する酵素であって、ブドウ科に属する植物由来である酵素。

【請求項 8】 フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に対して、脱フルクトシル作用を有する酵素であって、セリ科に属する植物由来である酵素。

【請求項 9】 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載の脱フルクトシル化方法により得られた反応生成物の 1 種又は 2 種以上を測定することを特徴とするフルクトシル化されているペプチド又はタンパク質の測定方法。

【請求項10】 脱フルクトシル化方法により得られた反応生成物が、グルコソン及び脱フルクトシルペプチドである請求項9記載のフルクトシル化されているペプチド又はタンパク質の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質から、酵素により脱フルクトシル化する方法及びその作用を有する新規酵素、並びに該方法により得られた反応生成物を測定することによる、フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質の測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ヘモグロビン (Hb) A1cは、そのβ鎖N末端バリンのアミノ基とグルコースのアルデヒド基が、非酵素的にシッフ塩基を形成した後、アマドリ転移を生じて安定化したアマドリ転移生成物であり、結果的にバリン残基にフルクトースが結合した構造を有する糖化タンパク質である。かかるHb A1cは、臨床的に過去1～2ヶ月の平均血糖値を反映することから、糖尿病管理の指標として重要であり、迅速、簡便かつ正確で実用的な定量法が求められている。

【0003】

IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) は、ヘモグロビンをエンドプロテアーゼGlu-Cにより加水分解して得られる、フルクトシルバリンの存在が疑われるβ鎖N末端の6ペプチドフラグメントをHPLCにより分離した後、キャピラリー電気泳動法又は質量分析法で定量する方法をHb A1cの実用基準法 (非特許文献1参照) としているが、この方法は、特別な装置を必要とするため、操作が煩雑で経済性が悪く、実用には不向きな方法である。

【0004】

現在、実用に供されているHb A1cの測定方法は、疎水基あるいは陽イオン交換基をもった特殊な硬質ゲルを担体として使用するHPLC法や抗Hb A1c

抗体を使用するラテックス免疫凝集法などであるが、高価な機器を必要としたり、多段階の免疫反応を必要とするなど、迅速性、簡便性、正確性を必ずしも満足する方法ではなかった。

#### 【0005】

近年、糖化タンパク質をプロテアーゼで分解し、糖化アミノ酸に作用するフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（FAOD）などの酵素を使用して、HbA1cやグリコアルブミンなどの糖化タンパク質を酵素法により測定しようとする方法が報告されている（特許文献1～8参照）。

これらの方法は、糖化タンパク質がHbA1c及びグリコアルブミンのいずれの場合であっても、FAODなどの酵素が、糖化タンパク質のままでは作用することが困難であるため、それぞれの糖化タンパク質に特徴的な糖化アミノ酸（HbA1cにおけるフルクトシルバリン、グリコアルブミンにおけるフルクトシルリジン）を糖化ペプチドあるいは糖化タンパク質より切り出して、FAODなどの基質とする方法である。したがって、FAODなどの基質となりうるように糖化アミノ酸を効率的に切り出す必要がある。

#### 【0006】

上記の目的のため、糖化タンパク質から糖化アミノ酸を効率的に切り出すプロテアーゼの探索が試みられ、多数のプロテアーゼが報告されているが、これらが実際に、糖化アミノ酸あるいは糖化アミノ酸を含むペプチドをどのように糖化タンパク質から切り出しているか、例えば、糖化タンパク質から、どのような長さのペプチド鎖が切り出されているかについては記載がなく、その意味から、前記記載が実用的なものであるか否かは不明であった。

一方、試料をプロテアーゼ処理し、遊離した糖化ペプチドに、糖化ペプチドオキシダーゼを作用させて、糖化タンパク質を測定しようとする方法が報告されている（特許文献9参照）。しかしながら、この方法に使用されている糖化ペプチドオキシダーゼは、実質的には、フルクトシルジペプチドに対して作用するものであり、ジペプチドよりも長いフルクトシルペプチドに対しては有効でなく、従来のFAODなどを使用する場合と同様、基質となりうるフルクトシルジペプチドを効率よく切り出す必要があるという課題が残っていた。

また、FAODを他の酵素と組み合わせて使用した報告もある（特許文献10参照）。しかし、この方法は、プロテアーゼで切り出した糖化アミノ酸にFAODを作用させた時に発生する過酸化水素と、同時に生成する糖化アミノ酸分解産物であるグルコソンにグルコースオキシダーゼを作用させて生成する過酸化水素の両方の過酸化水素を測定することによって、測定感度を向上させるものであり、長さの異なる糖化ペプチドについて、脱フルクトシル化を図るものではない。

**【0007】****【特許文献1】**

特開平5-192193号公報

**【特許文献2】**

特開平7-289253号公報

**【特許文献3】**

特開平8-154672号公報

**【特許文献4】**

特開平6-046846号公報

**【特許文献5】**

特開平8-336386号公報

**【特許文献6】**

国際公開第97/13872号パンフレット

**【特許文献7】**

国際公開第02/06519号パンフレット

**【特許文献8】**

特開2001-054398号公報

**【特許文献9】**

特開2001-095598号公報

**【特許文献10】**

特開2000-333696号公報

**【非特許文献1】**

Kobold U., et al ;Candidate reference methods for hemoglobinA1

c based on peptide mapping. Clin., Chem., 43, 1944-1951(1997)

#### 【 0 0 0 8 】

##### 【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明の目的は、H b A 1 c 等のフルクトシル化タンパク質や当該フルクトシル化タンパク質をプロテアーゼにより分解させた時に切り出される種々の長さのフルクトシル化されたペプチドに対して、脱フルクトシル作用を有する酵素、当該酵素を用いた脱フルクトシル化方法及び当該脱フルクトシル化反応を利用したフルクトシル化されたペプチド又はタンパク質の測定方法を提供することにある。

#### 【 0 0 0 9 】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成すべく、酵素を自然界から探索した結果、今までに報告されている F A O D などの脱フルクトシル作用を有する酵素が微生物由来であったのに対して、植物中にも脱フルクトシル作用を有する酵素が存在し、かつ当該植物由来の酵素は、フルクトシルペプチドのペプチド鎖の長さに係わらず脱フルクトシル作用を発揮することを見出し、本発明を完成した。

#### 【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は、フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に、植物から抽出された脱フルクトシル作用を有する酵素を作用させることを特徴とする脱フルクトシル化方法を提供するものである。

また本発明は、フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に対して、脱フルクトシル作用を有する酵素であって、バラ科、ショウガ科、ブドウ科又はセリ科に属する植物由来である酵素を提供するものである。

さらに本発明は、前記の脱フルクトシル化方法により得られた反応生成物の 1 種又は 2 種以上を測定することを特徴とするフルクトシル化されているペプチド又はタンパク質の測定方法を提供するものである。

#### 【 0 0 1 1 】

##### 【発明の実施の形態】

本明細書において「脱フルクトシル」とは、フルクトシルアミノ酸又はフルク



トシルペプチド（即ち、フルクトシル化されているアミノ酸又はペプチド）から、フルクトシル部分が酸化分解等を起こし、その結果、フルクトシル化されていないアミノ酸又はペプチドを生成することを意味する。

本発明に用いられる酵素（「脱フルクトシル化酵素」という）としては、フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に対して、脱フルクトシル作用を有する酵素であれば、特に制限されないが、様々な長さのフルクトシルペプチドに作用することから、植物由来の脱フルクトシル化酵素が好ましい。さらに、本発明酵素が含まれている植物としては、特に制限はないが、バラ科、ショウガ科、ブドウ科又はセリ科に属する植物が、特に好ましい。バラ科に属する植物としては、林檎、梨、桃、梅などが挙げられる。ショウガ科に属する植物としては、生姜、茗荷、ウコンなどが挙げられる。ブドウ科に属する植物としては、葡萄、蔦などが挙げられる。セリ科に属する植物としては、人参、セリ、三つ葉などが挙げられる。また、本発明酵素の植物からの抽出に際しては、脱フルクトシル化酵素が含まれている部位であれば特に制限されず、果実、葉、茎、花、根茎、根などの部位が利用できる。また、これらの植物の加工品、例えば、抽出液のジュースや凍結乾燥製剤なども利用できる。

#### 【0012】

上記植物から、脱フルクトシル化酵素を抽出する方法としては、上記植物を直接破碎して、圧搾等の処理により抽出液を得ることもできるが、適当な緩衝液等を加えてから破碎し、抽出することもできる。本発明においては、抽出液を用いることも可能であるが、精製した方がより好ましい。精製方法としては、公知の方法が利用でき、硫安分画やイオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトゲル、ゲル濾過等のカラムクロマトグラフィーを適宜組み合わせて使用することが出来る。また、植物抽出液中のポリフェノールの影響を除く為に、還元剤の添加や高分子吸収体での処理などを組み合わせることも可能である。

#### 【0013】

本発明の脱フルクトシル化酵素によれば、例えば糖化タンパク質をプロテアーゼ分解した際に、様々な長さのフルクトシルペプチドが生成されたとしても、本

発明酵素はこれらのすべてに作用する為、細断するための別のプロテアーゼの追加や処理時間を費やすことがなくなり、糖化タンパク質測定 of 効率化が図れる。また、臨床検査だけでなく、医療など様々な分野に応用が可能である。尚、本発明の脱フルクトシル化酵素は、基質であるフルクトシルペプチドから脱フルクトシル化する際に、F A O D のように酸化分解を行い過酸化水素等を発生させる作用を有していてもよい。この作用を有している場合は、生成する過酸化水素を、ペルオキシダーゼ等を用いた酵素的測定系に導けるので、特に好ましい。

#### 【0014】

本発明の脱フルクトシル化方法に用いるフルクトシル化ペプチド又はフルクトシル化タンパク質は、脱フルクトシル化酵素に作用するものであれば特に制限されないが、ヘモグロビンの  $\beta$  鎖 N 末端バリンがフルクトシル化されているフルクトシルペプチド及び H b A 1 c であることが特に好ましい。また、N 末端のバリンがフルクトシル化されているペプチドとしては、アミノ酸数には限定されないが、そのアミノ酸配列が配列番号 1 ～ 5 で表されるものが特に好ましい。

#### 【0015】

上記 N 末端のバリンがフルクトシル化されているペプチドは、かかる配列を有するペプチド又はタンパク質、例えば H b A 1 c を、適当なエンドプロテアーゼ又はエキソプロテアーゼ等を用いて処理することにより、調製することができる。これらプロテアーゼとしては、例えばエラスターゼ、プロテイナーゼ K、ペプシン、アルカリプロテアーゼ、トリプシン、プロリン特異エンドプロテアーゼ、V 8 プロテアーゼ、カルボキシペプチダーゼ A、カルボキシペプチダーゼ B 等が挙げられる。上記調製のためのこれらプロテアーゼの活性量としては、0.05 ～ 10000 U/mL、特に 10 ～ 2000 U/mL が好ましい。

#### 【0016】

フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に、本発明の脱フルクトシル化酵素を作用させる条件のうち処理温度は、20 ～ 50℃、特に 30 ～ 40℃ が好ましい。また、処理時間は、3分 ～ 100時間、特に 5分 ～ 20時間が好ましい。かかる処理により、グルコソン及び脱フルクトシルペプチドを含む反応生成物を得ることができる。従って、当該生成物の 1 種又は 2 種以上を測定すれば

、フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質を測定することができる。

#### 【0017】

また、本発明の脱フルクトシル化酵素活性の確認並びにフルクトシル化されているペプチド又はタンパク質の測定方法としては、生成した脱フルクトシルペプチドを、HPLCやキャピラリー電気泳動により分離同定することによって検出してもよいが、脱フルクトシルペプチドに適当なカルボキシペプチダーゼを作用させ、遊離してくるアミノ酸を検出、測定してもよい。例えば、N末端のバリンがフルクトシル化された配列番号5のペプチドを使用した場合には、カルボキシペプチダーゼの作用により、グルタミン酸 (G l u)、プロリン (P r o)、スレオニン (T h r)、ロイシン (L e u)、ヒスチジン (H i s)、バリン (V a l) を生成させることが出来るが、その中で、G l uはグルタミン酸脱水素酵素、L e uはロイシン脱水素酵素、V a lはバリン脱水素酵素を用いて、NADH又はNADPHの生成量を測定することによって検出、測定することも可能である。さらに、同時に生成するグルコソンに関しては、グルコースオキシダーゼを使用して、発生する過酸化水素を、ペルオキシダーゼ発色系を用いて、検出、測定することが出来る。また、脱フルクトシル反応の際に、過酸化水素が生成する脱フルクトシル化酵素を用いた場合は、直接生成した過酸化水素を、ペルオキシダーゼ発色系を用いて、検出、測定することも可能である。

#### 【0018】

ペルオキシダーゼ (P O D) 発色系は、特に制限はないが、反応系に色原体及びP O Dを添加し、該色原体を酸化して発色物質を生成させ、これを測定する方法が好適である。この色原体としては、4-アミノアンチピリンと、フェノール系化合物、ナフトール化合物又はアニリン系化合物との組み合わせ、MBTH (3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン) とアニリン系化合物との組み合わせ、ロイコメチレンブルー等が用いられる。また、特許第2516381号に記載されているように、P O D存在下にて過酸化水素と2価のコバルトイオンとの反応により生じた3価のコバルトイオンを、3価のコバルトイオンに特異的な指示薬、例えばTASBB (2-(2-チアゾリルアゾ)-5-ジスルフォベンチルアミノ安息香酸三ナトリウム塩) と組み合わせ、発色キレート化合物を生成

させ、これを測定する方法も利用できる。これによれば、上記方法の5～10倍の測定感度を得ることができる。また、過酸化水素を検出する試薬として、高感度に測定可能なTPM-PS (N, N, N', N', N'', N''-ヘキサ(3-スルフォプロピル)-4, 4', 4''-トリアミノトリフェニルメタン) (同仁化学社製) 等も利用できる。

#### 【0019】

本発明方法を用いれば、N末端のバリンがフルクトシル化されているペプチド又はタンパク質、例えばHbA1cを極めて高精度で定量することができる。ここでHbA1cの定量に使用される被験試料としては、例えば全血、赤血球等が挙げられる。

#### 【実施例】

次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

#### 【0020】

##### 実施例1

##### バラ科の植物由来脱フルクトシル化酵素の調製

梨の表皮及び種子周辺を除いた果肉部分100g当り、300mM塩化ナトリウムを含む100mM酢酸ナトリウム(pH4.5)を100mL加え、直接ミキサーにて破碎した後、遠心分離により固形物を除去し、粗抽出液を得た。この粗抽出液に、PVPP (ポリビニルポリピロリドン：ナカライテスク社製) を2%分添加し、室温で30分攪拌した。その後、遠心分離によりPVPPを除去し処理液を得た。これを粗精製酵素とした。

#### 【0021】

##### 実施例2

##### ショウガ科の植物由来脱フルクトシル化酵素の調製

生姜根茎を、直接ジューサーにて破碎し、放置の後、遠心分離により固形物を除去し、粗抽出液を得た。この粗抽出液に、濾過助剤としてセライト545 (商標名、ナカライテスク社製) を添加して攪拌後、濾紙を用いて吸引濾過を行った。濾液を再度、遠心分離し、抽出液を得た。得られた抽出液に、冷エタノールを

等量添加し、沈殿を形成させた。得られた沈殿を、少量の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解させ、DEAE トヨパールカラム (東ソー社製) に添加し、その非吸着画分を集めた。必要により、限外濾過濃縮を行い、これを粗精製酵素とした。

#### 【0022】

##### 実施例 3

##### ブドウ科の植物由来脱フルクトシル化酵素の調製

ブドウの表皮を除いて、果肉部分をミキサーで破碎した後、遠心分離により固形物を除去し、抽出液を得た。これを粗精製酵素とした。

#### 【0023】

##### 実施例 4

##### セリ科の植物由来脱フルクトシル化酵素の調製

人参の根茎部分を、直接ジューサーにて破碎した後、遠心分離により固形物を除去し、粗抽出液を得た。この粗抽出液を、マイレックスフィルター (0.45  $\mu$ m) (ミリポア社製) を用いて濾過を行い、澄明な抽出液を得た。この抽出液 3 mL に対して、冷エタノールを 4 mL 添加し、生じた沈殿を遠心分離によって除いた。得られた上清に、さらに冷エタノールを添加し、生じた沈殿を遠心分離により得た。得られた沈殿に、少量の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて溶解させ、これを粗精製酵素とした。

#### 【0024】

##### 実施例 5

##### フルクトシルペプチドの脱フルクトシル化方法

(バラ科由来脱フルクトシル化酵素の使用)

(i) 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 100  $\mu$ L に、配列番号 1~5 で表されるアミノ酸配列を有する N 末端のバリンがフルクトシル化されているペプチド (f-VH~f-VHLTP E: バイオクエスト社製) の各 500  $\mu$ M 水溶液 40  $\mu$ L、精製水 20  $\mu$ L および実施例 1 で得られた梨由来の粗精製酵素の溶液 40  $\mu$ L を加え、混和後、37℃ で 64 時間反応させた。この反応液を、分子量 10000 の限外濾過を行い、濾液を分取した (反応液 1~5)。この反応液 1

～5を、キャピラリー電気泳動装置C A P I - 3 2 0 0（大塚電子社製）にて、泳動緩衝液：150mMリン酸緩衝液（pH2.0）、電圧：15kV、検出波長：210nmの条件で分析を行い、ピーク位置およびピーク面積を測定した。

#### 【0025】

##### (ii) 対照試験

対照として、粗精製酵素溶液の代わりに、精製水を加え、同じ条件にて反応させ濾液を得た（対照液1～5）。この対照液1～5の分析結果を反応液1～5の結果と比較した。

尚、酵素反応及び対照試験に用いた各フルクトシルペプチドには、非フルクトシルペプチドが含まれており、2種のピークの変化で、酵素活性の有無を検出した。

#### 【0026】

反応液1の結果を図1に、対照液1の結果を図2に示した。図2では、f-VHに由来するピーク（面積：13mABU×sec）及びVHに由来するピーク（面積：34mABU×sec）が認められているが、図1では、f-VHのピークが減少（面積：4mABU×sec）し、VHのピークが増加（面積：38mABU×sec）しているのが確認された。

#### 【0027】

反応液2の結果を図3に、対照液2の結果を図4に示した。図4では、f-VHLに由来するピーク（面積：32mABU×sec）及びVHLに由来するピーク（面積：22mABU×sec）が認められているが、図3では、f-VHLのピークが減少（面積：7mABU×sec）し、VHLのピークが増加（面積：34mABU×sec）しているのが確認された。

#### 【0028】

反応液3の結果を図5に、対照液3の結果を図6に示した。図6では、f-VHLTに由来するピーク（面積：38mABU×sec）及びVHLTに由来するピーク（面積：20mABU×sec）が認められているが、図5では、f-VHLTのピークが減少（面積：5mABU×sec）し、VHLTのピークが増加（面積：32mABU×sec）しているのが確認された。

## 【0029】

反応液4の結果を図7に、対照液4の結果を図8に示した。図8では、f-VHLTPに由来するピーク（面積：64mABU×sec）及びVHLTPに由来するピーク（面積：23mABU×sec）が認められているが、図7では、f-VHLTPのピークが減少（面積：8mABU×sec）し、VHLTPのピークが増加（面積：57mABU×sec）しているのが確認された。

## 【0030】

反応液5の結果を図9に、対照液5の結果を図10に示した。図10では、f-VHLTPEに由来するピーク（面積：54mABU×sec）及びVHLTPEに由来するピーク（面積：21mABU×sec）が認められているが、図9では、f-VHLTPEのピークが減少（面積：9mABU×sec）し、VHLTPEのピークが増加（面積：48mABU×sec）しているのが確認された。

## 【0031】

これらの結果から、バラ科の植物由来脱フルクトシル化酵素を使用することにより、フルクトシルペプチドから脱フルクトシル化することができることが分かった。

## 【0032】

## 実施例6

## フルクトシルペプチドの脱フルクトシル化方法

（ショウガ科由来脱フルクトシル化酵素の使用）

実施例2で得られた粗精製酵素についても、実施例5と同様の条件下で試験を行った。但し、N末端のバリニンがフルクトシル化されているペプチドはf-VHLを使用し、反応時間は37℃で16時間とした（反応液6）。

## 【0033】

反応液6の結果を図11に示す。対照液の結果は、上記の図4で兼用した。図4では、f-VHLに由来するピーク（面積：32mABU×sec）及びVHLに由来するピーク（面積：22mABU×sec）が認められているが、図11では、f-VHLのピークが消失し、VHLのピークが増加（面積：32mABU×sec）しているのが確認された。

この結果から、ショウガ科の植物由来脱フルクトシル化酵素を使用することにより、フルクトシルペプチドから脱フルクトシル化することができることが分かった。

#### 【0034】

##### 実施例 7

##### フルクトシルペプチドの脱フルクトシル化方法

(ブドウ科由来脱フルクトシル化酵素の使用)

実施例 3 で得られた粗精製酵素についても、実施例 5 と同様の条件下で試験を行った。但し、N 末端のバリンがフルクトシル化されているペプチドは、VH を含まない f-VH を使用し、反応時間は 37℃ で 16 時間とした (反応液 7)。また、対照試験は、実施例 5 に準じて行った (対照液 6)。

#### 【0035】

反応液 7 の結果を図 12 に、対照液 6 の結果を図 13 に示す。図 13 では、f-VH に由来するピーク (面積: 42mABU×sec) のみが確認されが、図 12 では、f-VH のピークが減少 (面積: 36mABU×sec) し、新たに反応生成物のピーク (面積: 4mABU×sec) が認められた。さらに、この反応液に VH を少量添加し、再度キャピラリー電気泳動でピークの増減を確認したところ、反応生成物と VH のピークが一致したことから、反応生成物は VH であることが確認できた。

この結果から、ブドウ科の植物由来脱フルクトシル化酵素を使用することにより、フルクトシルペプチドから脱フルクトシル化することができることが分かった。

#### 【0036】

##### 実施例 8

##### フルクトシルペプチドの脱フルクトシル化方法

(セリ科由来脱フルクトシル化酵素の使用)

実施例 4 で得られた粗精製酵素については、実施例 7 と同様の条件下で試験を行った (反応液 8)。

#### 【0037】

反応液 8 の結果を図 14 に示す。対照液の結果は、上記の図 13 で兼用した。



図13では、f-VHに由来するピーク（面積：42mABU×sec）のみが認められているが、図14では、f-VHのピークが減少（面積：16mABU×sec）し、新たに反応生成物のピーク（面積：16mABU×sec）が認められた。さらに、この反応液にVHを少量添加し、再度キャピラリー電気泳動でピークの増減を確認したところ、反応生成物とVHのピークが一致したことから、反応生成物はVHであることが確認できた。

この結果から、セリ科の植物由来脱フルクトシル化酵素を使用することにより、フルクトシルペプチドから脱フルクトシル化することができることが分かった。

#### 【0038】

##### 【発明の効果】

本発明の脱フルクトシル化酵素により、N末端のバリニンがフルクトシル化されているペプチド又はタンパク質から脱フルクトシル化することができる。さらに、反応生成物を定量することによって、N末端のバリニンがフルクトシル化されているペプチド、タンパク質、タンパク質のサブユニット等、例えばHbA1c等が正確に定量できる。

#### 【0039】

##### 【配列表】

##### SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.

<120> A process of manufacturing fructosyl-valine

<130> P04781410

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Val His

1

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Val His Leu

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Val His Leu Thr

1

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Val His Leu Thr Pro

1

5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Val His Leu Thr Pro Glu

1

5

【図面の簡単な説明】

【図 1】

バラ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルジペプチド（f-VH）に作用させた反応液 1 のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

**【図 2】**

精製水をフルクトシルジペプチド (f-VH) に作用させた対照液 1 のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

**【図 3】**

バラ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルトリペプチド (f-VHL) に作用させた反応液 2 のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

**【図 4】**

精製水をフルクトシルトリペプチド (f-VHL) に作用させた対照液 2 のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

**【図 5】**

バラ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルテトラペプチド (f-VHLT) に作用させた反応液 3 のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

**【図 6】**

精製水をフルクトシルテトラペプチド (f-VHLT) に作用させた対照液 3 のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

**【図 7】**

バラ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルペンタペプチド (f-VHLTP) に作用させた反応液 4 のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

**【図 8】**

精製水をフルクトシルペンタペプチド (f-VHLTP) に作用させた対照液 4 のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

**【図 9】**

バラ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルヘキサペプチド (f-VHLTPE) に作用させた反応液 5 のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

。

**【図 10】**

精製水をフルクトシルヘキサペプチド (f-VHLTPE) に作用させた対照液 5 のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

**【図 11】**

ショウガ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルトリペプチド (f-VHL) に作用させた反応液 6 のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

【図 1 2】

ブドウ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルジペプチド (f-VH) に作用させた反応液 7 のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

【図 1 3】

精製水をフルクトシルジペプチド (f-VH) に作用させた対照液 6 のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

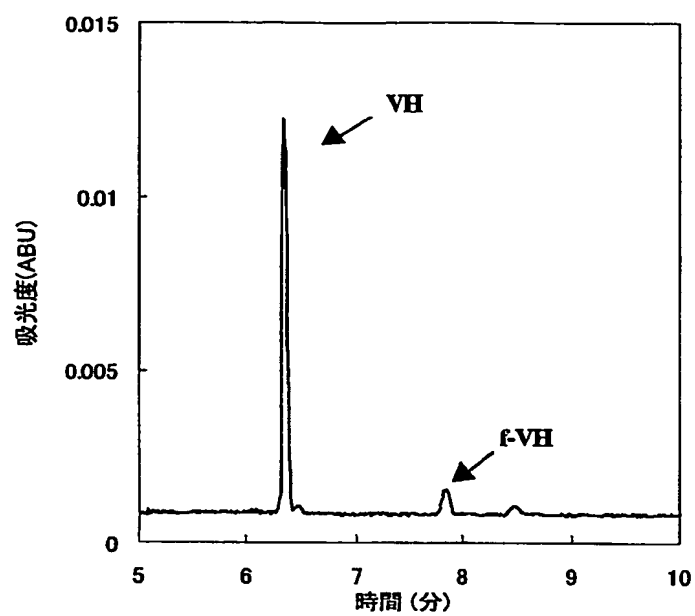
【図 1 4】

セリ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルジペプチド (f-VH) に作用させた反応液 8 のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

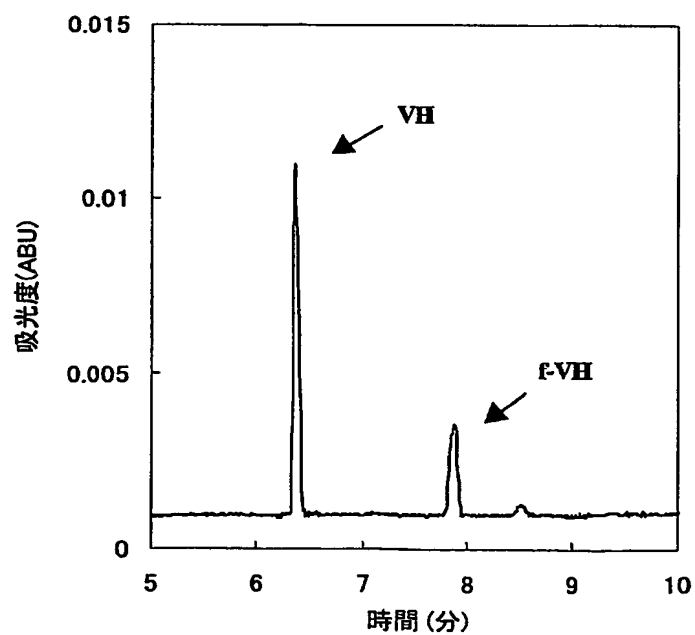
【書類名】

図面

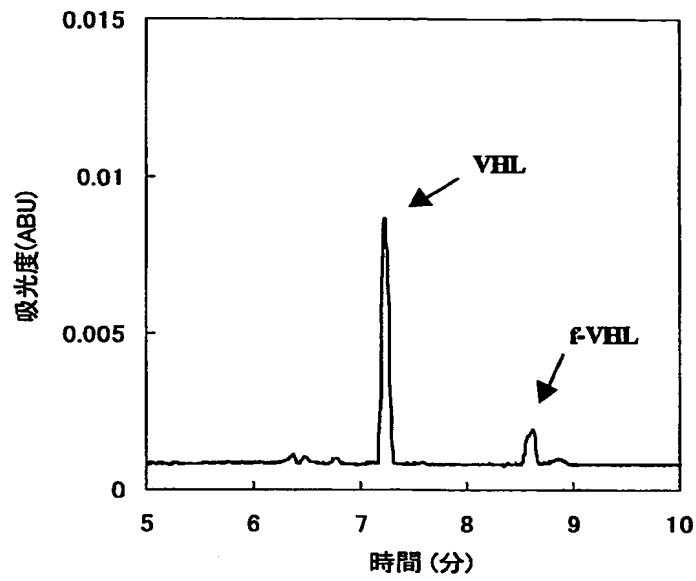
【図 1】



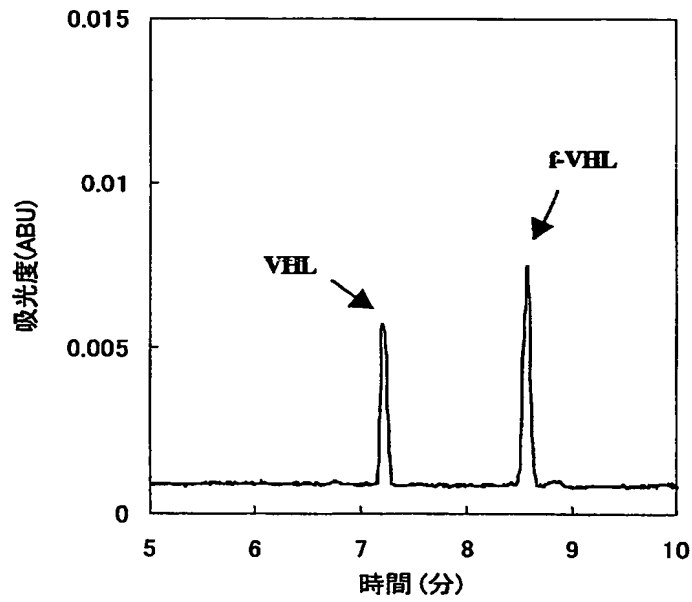
【図 2】



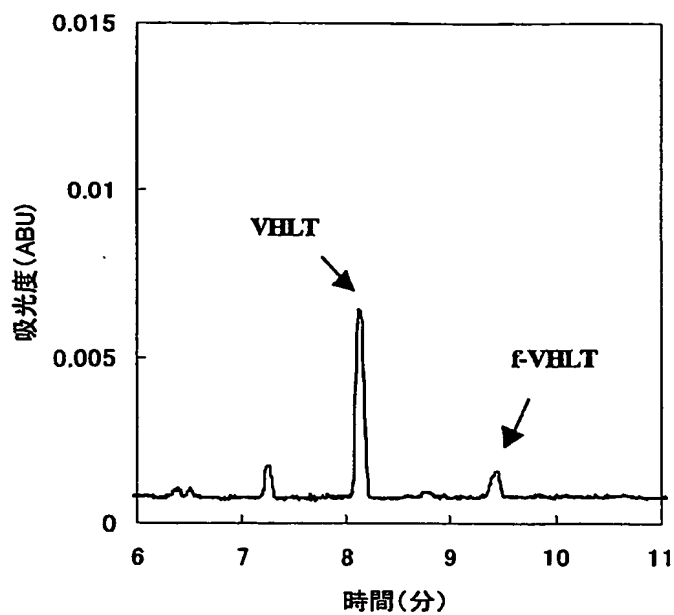
【図 3】



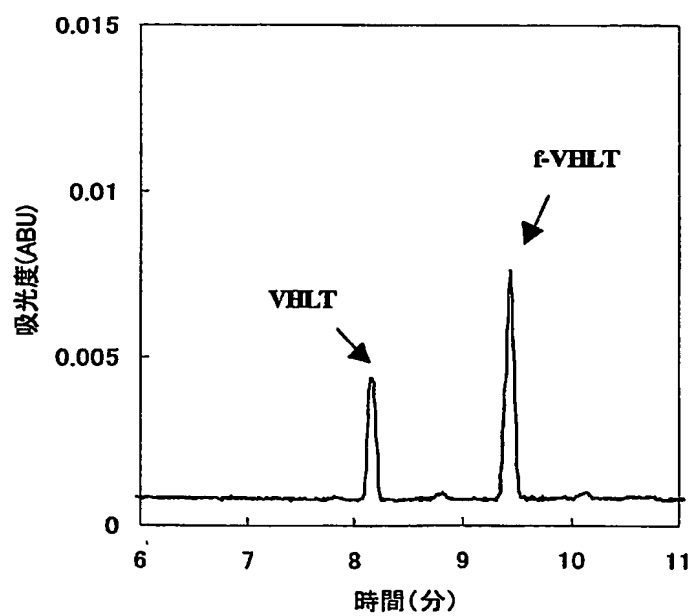
【図 4】



【図 5】

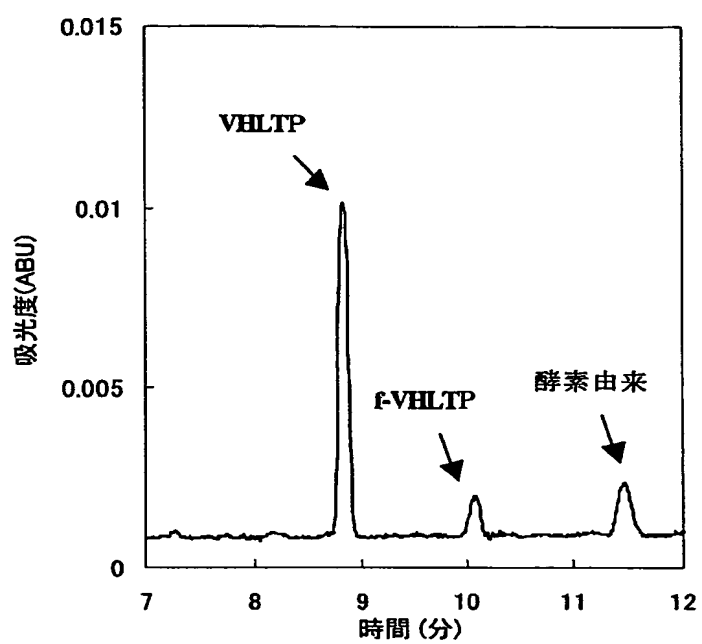


【図 6】

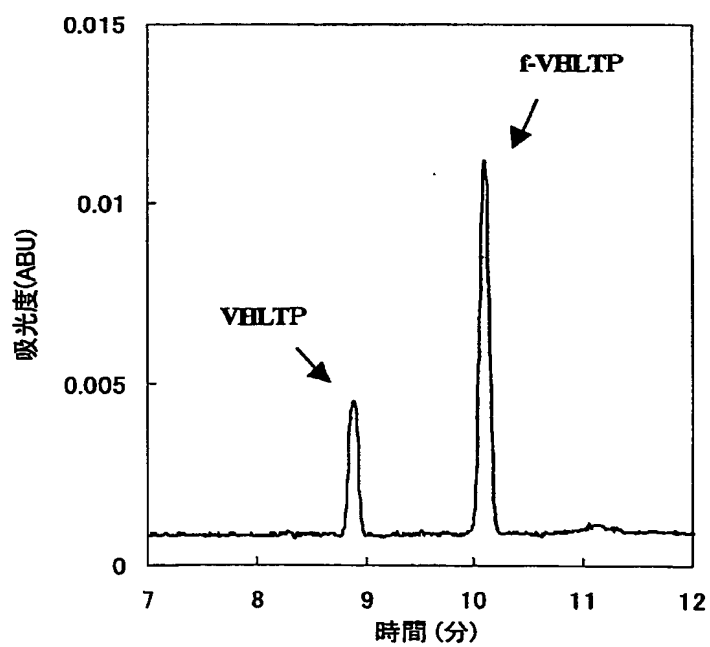




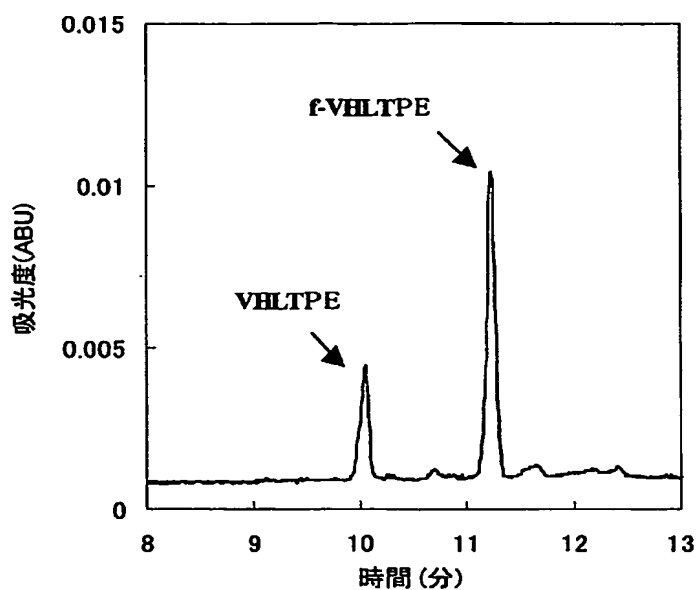
【図 7】



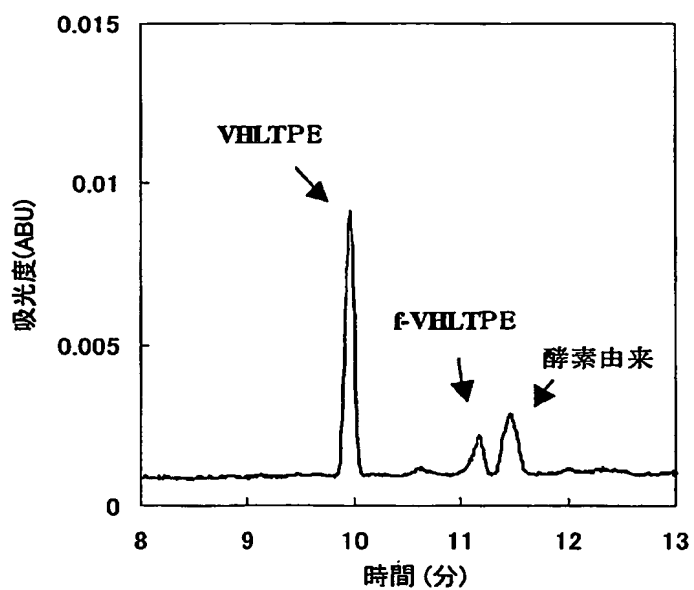
【図 8】



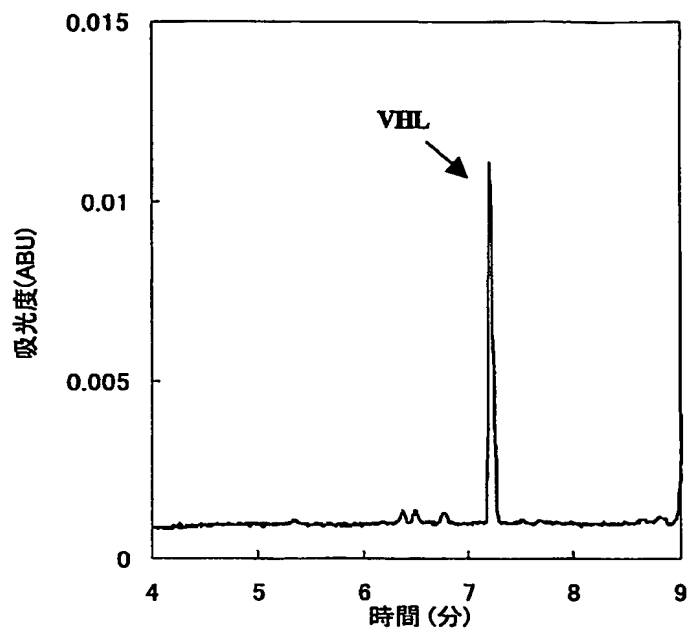
【図 9】



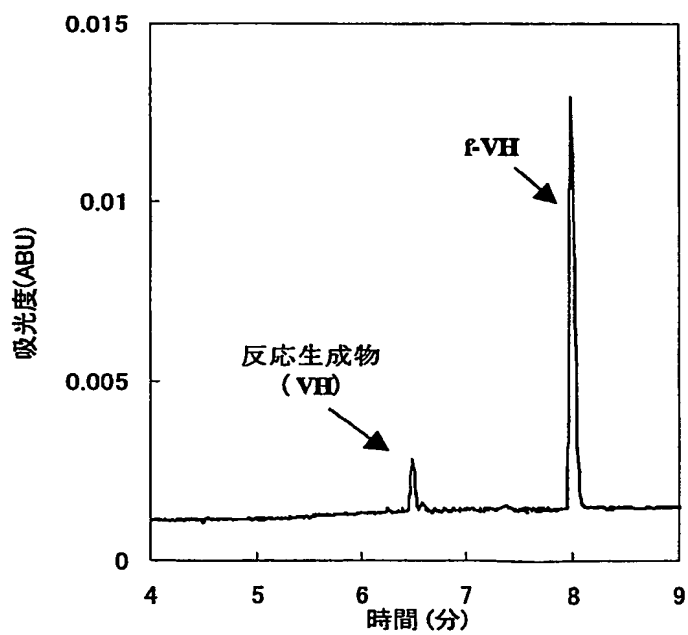
【図 10】



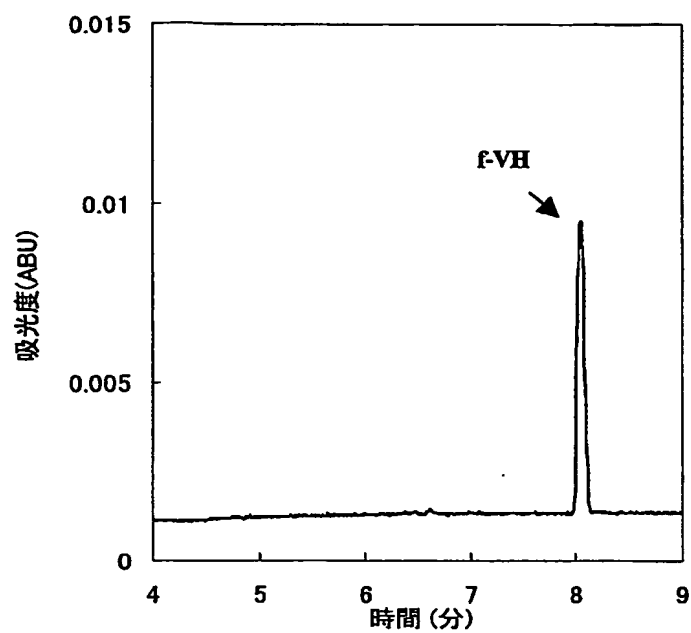
【図 1 1】



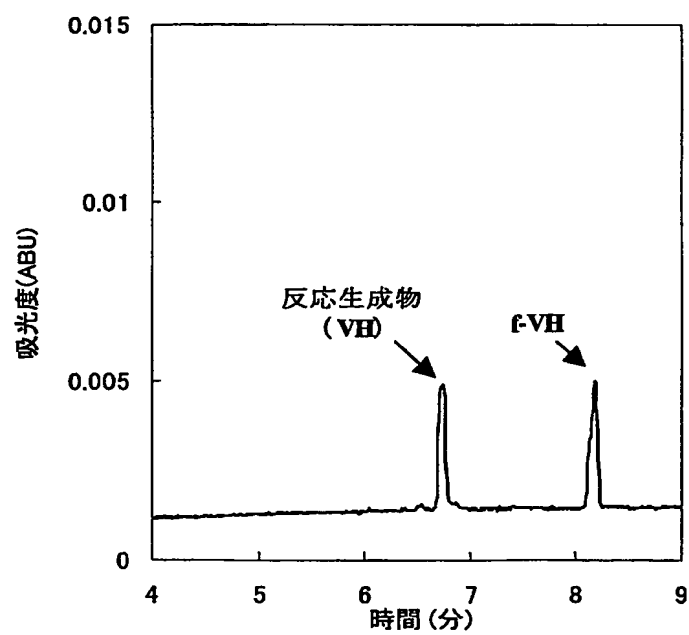
【図 1 2】



【図 13】



【図 14】



【書類名】 要約書

【要約書】

【課題】 フルクトシルペプチドのペプチド鎖の長さにかかわらず脱フルクトシル作用を示す酵素、これを用いた脱フルクトシル化方法及びフルクトシル化ペプチド又はタンパク質の測定方法の提供。

【解決手段】 植物由来の脱フルクトシル化酵素、これを用いたフルクトシル化ペプチド又はタンパク質からの脱フルクトシル化方法、及びフルクトシル化ペプチド及びタンパク質の測定方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-308731
受付番号	50201597844
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0095
作成日	平成14年10月24日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年10月23日
-------	-------------

次頁無

特願 2 0 0 2 - 3 0 8 7 3 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 9 0 0 3 7 3 2 7 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 1 2 月 1 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋 3 丁目 1 3 番 5 号

氏 名

第一化学薬品株式会社